

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

21.11.03

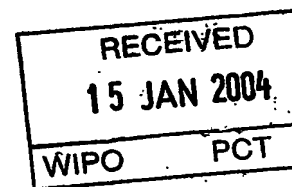
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年 1 1 月 2 2 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 3 3 9 4 1 8  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 2 - 3 3 9 4 1 8 ]

出      願      人  
Applicant(s):                      エーザイ株式会社  
                                        独立行政法人産業技術総合研究所

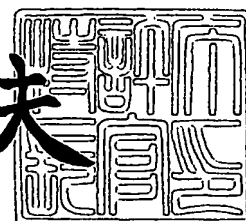


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 2 月 2 5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 E1-A0209

【提出日】 平成14年11月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市松代2丁目20番6号

    【氏名】 畑 桂

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市二の宮4丁目4番2号

    【氏名】 塚原 克平

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

    【氏名】 地神 芳文

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

    【氏名】 仲山 賢一

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

    【氏名】 梅村 真理子

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

    【氏名】 岡本 美智代

【特許出願人】

    【識別番号】 000000217

    【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

## 【特許出願人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

## 【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 10,500円

【その他】 国等以外の全ての者の持分の割合 0 5 0 / 1 0 0

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

**【書類名】 明細書**

**【発明の名称】** GWT1遺伝子産物の酵素活性を阻害する化合物をスクリーニングする方法

**【特許請求の範囲】**

**【請求項 1】** 抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(1) 過剰発現させたGWT1遺伝子にコードされる蛋白質と、被検試料とを接触させる工程、

(2) GlcN-(acyl)PIを検出する工程、

(3) GlcN-(acyl)PIを減少させる被検試料を選択する工程、を含む方法。

**【請求項 2】** GWT1遺伝子が下記 (a) から (d) のいずれかに記載のDNA、

(a) 配列番号：2、4、6、8、10または14に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA

(b) 配列番号：1、3、5、7、9、11、12または13に記載の塩基配列を含むDNA

(c) 配列番号：1、3、5、7、9、11、12または13に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

(d) 配列番号：2、4、6、8、10または14に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、である請求項1に記載の抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法。

**【請求項 3】** アシル化されたGPIを検出する工程が薄相クロマトグラフィーである、請求項1または2に記載の方法。

**【請求項 4】** さらに、(4) 選択された被検試料が、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、GPIアンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否か、または、真菌の増殖を抑制するか否かを検定する工程、を含む、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【0001】**

**【発明の属する技術分野】**

真菌の細胞壁合成に關与するGPI合成酵素阻害活性を有する抗真菌剤をスクリーニングする方法に關する。

**【0002】****【従来の技術】**

本發明者らは、真菌が病原性を發揮するためには宿主細胞に付着することが重要であり、付着に關与する付着因子は一旦細胞膜にGPI (Glycosylphosphatidylinositol) アンカリングした後、細胞壁表層に輸送されることに着目した（非特許文献1）。そしてGPIでアンカリングされた蛋白質（GPIアンカー蛋白質）が細胞壁に輸送される過程を阻害することにより、真菌細胞壁の合成を阻害し、同時に宿主細胞への付着も阻害する新規抗真菌剤が創出できると考えて研究に着手した。

**【0003】**

尚、本出願の發明に關連する先行技術文献情報を以下に示す。

【非特許文献1】 Hamada K et al, Mol. Gen. Genet., 258: 53-59, 1998

**【0004】****【發明が解決しようとする課題】**

本發明の課題は、真菌細胞壁へのGPIアンカー蛋白質の輸送を阻害して真菌細胞壁の合成を阻害するとともに、宿主細胞への付着を阻害して、病原性真菌が病原性を發揮できないようにする抗真菌剤を開発することにある。

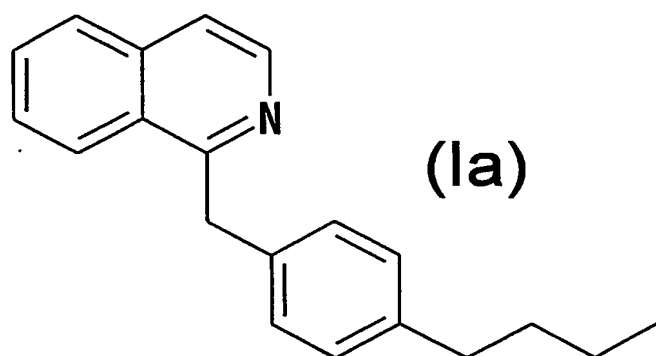
**【0005】****【課題を解決するための手段】**

本發明者らはWO 02/04626で、*Saccharomyces cerevisiae*において配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAがコードする蛋白質が、*Candida albicans*において配列番号3及び5に記載の塩基配列を有するDNAがコードする蛋白質が、*Schizosaccharomyces pombe*において配列番号7に記載の塩基配列を有するDNAがコードする蛋白質が、*Aspergillus fumigatus*において配列番号9及び11に記載の塩基配列を有するDNAがコードする蛋白質が、*Cryptococcus neoformans*において配列番号12及び13に記載の塩基配列を有するDNAがコードする蛋白質が、GPI

アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に関与することを見出しGWT1遺伝子と命名した。更に、該遺伝子を欠失した真菌が細胞壁を合成できないこと、式(Ia)に示す化合物が該蛋白質と結合して、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送を阻害し、真菌の細胞壁合成を阻害することを見出した。

【0006】

【化1】



【0007】

そして、GWT1遺伝子産物（以下GWT1蛋白）が、GPIの生合成経路（図1、Kinoshita and Inoue, Curr Opin Chem Biol 2000 Dec;4(6):632-8; Ferguson et al., Biochim Biophys Acta 1999 Oct 8;1455(2-3):327-40) 中のGlcN-PIにアシル基を転移しGlcN-(acyl)PIを合成する活性を有することを見出し、本活性を阻害する化合物をスクリーニングすることにより真菌細胞壁の合成を阻害する化合物を見出すことができると考えて、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は、下記1から7を提供するものである。

1. 抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法であって、
  - (1) 過剰発現させたGWT1遺伝子にコードされる蛋白質と、被検試料とを接触させる工程、
  - (2) GlcN-(acyl)PIを検出する工程、
  - (3) GlcN-(acyl)PIを減少させる被検試料を選択する工程、を含む方法。

【0009】

ここでGWT1とはW0 02/04626に開示された真菌の細胞壁合成遺伝子であり、過

剰発現させたとは本来持っていた遺伝子ではなく、外部から導入した遺伝子から発現させることを意味する。

#### 【0010】

また、GlcN-(acyl)PIとはGPIの生合成経路 (図1、Kinoshita and Inoue, Curr Opin Chem Biol 2000 Dec;4(6):632-8; Ferguson et al., Biochim Biophys Acta 1999 Oct 8;1455(2-3):327-40) 中のGlucosaminyl-phosphatidylinositol (GlcN-PI) のInositolにアシル基が結合したGlucosaminyl-acylphosphatidylinositolである。

#### 【0011】

2. GWT1遺伝子が下記 (a) から (d) のいずれかに記載のDNA、

(a) 配列番号: 2、4、6、8、10または14に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA

(b) 配列番号: 1、3、5、7、9、11、12または13に記載の塩基配列を含むDNA

(c) 配列番号: 1、3、5、7、9、11、12または13に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

(d) 配列番号: 2、4、6、8、10または14に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、である請求項1に記載の抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法。

#### 【0012】

ここで、「ストリンジェントな条件」とは、例えば65℃ 4 x SSCにおけるハイブリダイゼーション、次いで65℃で1時間0.1 x SSC中での洗浄である。また別法としてストリンジェントな条件は、50%ホルムアミド中42℃ 4 x SSCである。また、PerfectHyb™ (TOYOBO) 溶液中65℃2.5時間ハイブリダイゼーション、次いで1).2xSSC, 0.05% SDS溶液:25℃5分、2).2xSSC, 0.05% SDS溶液:25℃15分、3).0.1xSSC, 0.1% SDS溶液50℃20分の洗浄といった条件も許される。

#### 【0013】

また、「1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／または挿入さ

れたアミノ酸配列からなる蛋白質」は、当業に公知の方法、例えば、部位特異的変異誘発法 (Sambruck, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) などを用いて調製することができる。また、このような変異は自然界において生じることもある。アミノ酸の変異数は、標識化合物との結合活性が保持される限り特に制限はない。典型的には、30アミノ酸以内であり、好ましくは、10アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。アミノ酸の変異部位も、上記活性が保持される限り特に制限はない。

#### 【0014】

上記ハイブリダイゼーションを利用して調製される蛋白質や変異蛋白質は、通常、配列番号: 2、4、6、8、10または14に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質とそのアミノ酸配列において高い相同性 (例えば、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、あるいは95%以上の相同性) を有する。アミノ酸配列の相同性は、BLASTx (アミノ酸レベル) のプログラム (Altschul et al. *J. Mol. Biol.* 1.215:403-410, 1990) を利用して決定することができる。該プログラムは、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877, 1993) に基づいている。BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えば *score* = 50、*wordlength* = 3とする。また、Gapped BLASTプログラムを用いて、アミノ酸配列を解析する場合は、Altschulら (*Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997) に記載されているように行うことができる。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

#### 【0015】

3. アシル化されたGPIを検出する工程が薄相クロマトグラフィーである、請求項1から2のいずれかに記載の方法。

4. さらに、(4) 選択された被検試料が、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、GPIアンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否か、または、真菌の増殖を抑制するか否かを検定する工程、を含む、請求項1



から3のいずれかに記載の方法。

#### 【0016】

##### 【発明の実施の形態】

以下に本発明に記載された、1. GWT1蛋白を調製する方法、2. アシル基転移活性の測定方法について開示する。

##### 1. GWT1蛋白を調製する方法

GWT1蛋白は、真菌、好ましくは*S. cerevisiae*、*C. albicans*、*S. pombe*、*A. fumigatus*、*C. neoformans*、更に好ましくは*S. cerevisiae*の膜画分から調製する。アシル基転移活性の測定は、調製した膜画分をそのまま使用してもよいし、更に精製して用いてもよい。真菌に、配列番号1、3、5、7、9、11、12または13に記載の塩基配列のDNAを導入して、GWT1蛋白を過剰発現させることにより、アシル基転移活性の測定を容易に行うことが可能である。以下に*S. cerevisiae*の場合について具体的に説明する。

#### 【0017】

##### (1)GWT1遺伝子の導入

GWT1遺伝子は、配列番号1、3、5、7、9、11、12または13に記載の塩基配列を基にプライマーを設計し、真菌のDNAを鋳型としてPCRを行うことにより得ることができる。

GWT1遺伝子を*S. cerevisiae*で働く発現ベクター、例えばYEpl352のマルチクローニングサイトに適当なプロモーター・ターミネーター、例えばpKT10 (Tanaka et al, Mol. Cell Biol., 10:4303-4313, 1990) 由来のGAPDHプロモーター及びGAPDHターミネーターを挿入した発現ベクターに挿入してGWT1発現プラスミドを作製する。*S. cerevisiae*例えばG2-10株を、適当な培地例えばYPD培地(Yeast extract-Polypeptone-Dextrose培地)にて、適当な温度例えば30℃で振とう培養し、対数増殖後期の時点で集菌する。洗浄後、例えば酢酸リチウム法によりGWT1発現プラスミドを*S. cerevisiae*に導入する。酢酸リチウム法についてはYEAST MAKER<sup>TM</sup> Yeast Transformation System (Clontech社製) User Manualに記載されている。SD(ura-)培地で30℃、2日間培養することによりGWT1過剰発現株および空ベクター導入株を得ることができる。

## 【0018】

また、GWT1遺伝子を導入する菌株は、好ましくは自身のGWT1遺伝子を欠失した欠失株であることが望ましい。GWT1遺伝子を欠失した*S. cerevisiae*は、以下の方法により得ることができる。

マーカー遺伝子、好ましくは*S. pombe*のhis5遺伝子を鋳型とし、両端に30 bp以上好ましくは40 bp以上の欠失したいGWT1遺伝子の配列（例えば配列番号1に記載の配列）を含んだPCR産物が得られるように設計したプライマーを用いPCR増幅を行う。PCR産物を精製し、真菌に導入後、マーカー遺伝子に対応した選択、his5であればhis<sup>-</sup>の培地で培養して、欠失株を得ることができる。

## 【0019】

*S. cerevisiae*以外の真菌の発現ベクター及び遺伝子導入法は、*S. pombe*の発現ベクターpcL等及びその導入法についてIgarashi et al, Nature 353:80-83, 1991に、*C. albicans*の発現ベクターpRM10等及びその導入法についてPla J et al, Yeast, 12: 1677-1702, 1996に、*A. fumigatus*の発現ベクターpAN7-1等及びその導入法についてPunt PJ et al, GENE, 56: 117-124, 1987に、*C. neoformans*の発現ベクターpPM8等及びその導入法についてMonden P et al, FEMS Microbiol. Lett., 187: 41-45, 2000に記載されている。

また、*C. albicans*の欠失株の作製法は、Fonzi WA et al, Genetics 134: 717-728, 1993に記載されている。

## 【0020】

## (2)膜画分の調製法

GWT1遺伝子を導入した*S. cerevisiae*を、適当な培地例えばSD(ura<sup>-</sup>)液体培地にて、適当な温度例えば24℃で振とう培養し、対数増殖中期の時点で集菌する。菌体をTM buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>)で洗浄した後、適量例えば2 mlのTM buffer + protease inhibitor (Complete<sup>TM</sup> (Roche社製))にて懸濁し、適量例えば1.5 mlのガラスビーズを加える。これをボルテックスしては氷上に置く操作を繰り返して（例えば、30秒間ボルテックスして30秒間氷上に置く操作を10回繰り返して）菌体を破碎する。

遠心例えば1,000 gで5分間遠心してガラスビーズおよび未破碎の菌体を沈殿さ

せる。上清を別のチューブにとり、遠心例えば13,000 gで20分間遠心することによりオルガネラを含む膜画分 (Total membrane fraction) を沈殿させる。必要ならば、更に沈殿を1 mlの適当なassay用のバッファーに懸濁し、遠心例えば1,000 gで1分間遠心することにより懸濁されなかった部分を取り除き、上清を遠心例えば13,000 gで20分間遠心して沈殿を適当なassay用のバッファーに再懸濁し膜画分とする。

#### 【0021】

*S. cerevisiae*以外の真菌の膜画分調製は、*S. pombe*についてはYoko-o et al, Eur. J. Biochem. 257:630-637 (1998)に、*C. albicans*についてはSentandreu M et al, J. Bacteriol., 180: 282-289, 1998に、*A. fumigatus*についてはMouyna I et al, J. Biol. Chem., 275: 14882-14889, 2000に、*C. neoformans*についてはThompson JR et al, J. Bacteriol., 181: 444-453, 1999に記載の方法により行うことができる。

#### 【0022】

別法としてGWT1蛋白は、真菌以外の細胞、例えば哺乳類細胞、昆虫細胞、大腸菌等で発現させ、調製することができる。

哺乳類細胞では、例えばCMVプロモーターを持つ過剰発現用ベクターにつないだGWT1を哺乳類細胞に導入し、Petaja-Repo et al., J. Biol. Chem., 276:4416-23, 2001に記載の方法により膜画分を調製することができる。

#### 【0023】

昆虫細胞では、例えばBAC-TO-BAC Baculovirus Expression system (GIBCO BRL社製) 等のバキュロウイルス発現キットを用いてGWT1発現昆虫細胞 (Sf9細胞など) を作製し、ここからOkamoto et al., J. Biol. Chem., 276:742-751, 2001に記載の方法により膜画分を調製することができる。

大腸菌では、例えばpGEX (Pharmacia社製) の大腸菌発現用ベクターにGWT1をつなぎ、BL21などの大腸菌に導入しGWT1蛋白を調製することができる。

#### 【0024】

### 2. アシル基転移活性の測定方法

GPIにアシル基を転移する反応の検出は、Costello and Orlean, J. Biol. Che

m. (1992) 267:8599-8603; または Franzot and Doering, Biochem. J. (1999) 340:25-32 に報告されている方法により可能である。以下に具体的な方法の例を挙げるが、以下の実験条件は使用する GWT1 遺伝子産物に合わせて最適化することが好ましい。

適当な金属イオン (Mg、Mn)、ATP、Coenzyme A、及び好ましくは UDP-GlcNAc が他の反応に使われるのを阻害する阻害剤、例えばキチンの合成阻害剤として nikkomycin Z、アスパラギン結合型糖鎖の合成阻害剤として tunicamycin を含むバッファーに、1 で調整した GWT1 遺伝子産物、好ましくは GWT1 遺伝子産物を含む膜画分を加え、更に被検化合物を加えて適当な温度で適当な時間 (例えば 24℃ で 15 分間) 保温する。

#### 【0025】

その後、適当に標識した、好ましくは放射性同位元素で標識した GlcN-(acyl)PI の前駆体、例えば UDP-GlcNAc、Acyl-Coenzyme A、好ましくは UDP-[<sup>14</sup>C]GlcNAc を加えて、更に適当な時間 (例えば 24℃ で 1 時間) 保温する。クロロホルム：メタノール (1:2) を添加し攪拌して反応を止め脂質を抽出する。抽出した反応産物を適当な溶媒、好ましくはブタノールに溶解し、HPLC・薄層クロマトグラフィー (TLC) 等の方法、好ましくは TLC により、反応で生成した GlcN-(acyl)PI を分離する。TLC で展開する場合、展開溶媒は例えば CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (65:25:4)、CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/1M NH<sub>4</sub>OH (10:10:3)、CHCl<sub>3</sub>/pyridine/HCOOH (35:30:7) 等適宜選択することができるが、好ましくは HCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/1M NH<sub>4</sub>OH (10:10:3) により展開する。分離した GlcN-(acyl)PI を、標識に対応した方法、放射性同位元素で標識したのであれば、分離した GlcN-(acyl)PI の放射活性により定量する。

被検化合物が存在する場合に、生成する GlcN-(acyl)PI が減少すれば、被検化合物に GWT1 蛋白によるアシル基転移を抑制する活性がある判断される。

#### 【0026】

このようなアシル基転移を抑制する活性が検出された被検試料は、さらに、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、GPI アンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否か、または、真菌の増殖を抑制するか否かを検定することが好ましい。この検定の結果、被検試料が、GPI アンカー蛋白質の細

胞壁への輸送過程を阻害、GPIアンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害、または、真菌の増殖を阻害した場合には、該試料は抗真菌剤の有力な候補となる。

#### 【0027】

被検試料が、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、あるいはGPIアンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否かは、(1). レポート酵素を用いる方法、(2). 真菌細胞壁の表層糖蛋白質と反応する抗体を用いる方法、(3). 動物細胞に対する付着能により検定する方法、(4). 真菌を光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡で観察する方法により検定できる。

#### 【0028】

(1)～(4)の方法はW0 02/04626の発明の開示に示されており、実施例に具体的に開示されている。(1)～(4)の方法により、好ましくは(1)～(4)の方法を組み合わせ用いることにより、被検試料がGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害する、あるいはGPIアンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害すると判断され、しかも本件発明に記載のDNAがコードする蛋白質を、真菌に過剰発現させることにより、その阻害の程度が減弱する、あるいは阻害が見られなくなる場合に、被検試料は、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与えたと判断される。

#### 【0029】

また被検試料が真菌の増殖を抑制するか否かは、通常の抗真菌活性を測定する方法により検定できる (National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Proposed standard M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.)。

#### 【0030】

##### 【実施例】

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

##### 【実施例1】 GWT1蛋白を発現した膜画分の調製

##### (1). GWT1発現プラスミドの作製

*S. cerevisiae* で働く発現ベクターを作製するため、YEp352のマルチクローニングサイトにpKT10 (Tanaka et al, Mol. Cell Biol., 10:4303-4313, 1990) 由来のGAPDHプロモーターおよびGAPDHターミネーターを挿入し、更にマルチクローニングサイトをpUC18マルチクローニングサイトに置き換えてYEp352GAPIIを作製した。またGWT1遺伝子の挿入を容易にするため、マルチクローニングサイトに存在するSalIサイトをClaIサイトに変換したYEp352GAPIIClaI $\Delta$ Salを作製した。

配列番号1に記載の塩基配列を含む*S. cerevisiae* GWT1遺伝子を配列番号15に記載のプライマーおよび配列番号16に記載のプライマーを用いて増幅し、YEp352GAPIIClaI $\Delta$ Salベクターのマルチクローニングサイトに挿入してGWT1過剰発現プラスミドを作製した。

#### 【0031】

##### (2).GWT1遺伝子を欠失した*S. cerevisiae* $\Delta$ gwt1株の作製

*S. pombe*のhis5遺伝子 (Longtine MS et al, Yeast, 14: 953-961, 1998) を鋳型とし、配列番号17及び配列番号18をプライマーとして、両端にGWT1配列を含むhis5カセットをPCRで増幅した。

*S. cerevisiae*を培養・集菌し、上述のPCR産物で形質転換した。SD(His-)培地で30℃、5～7日間培養することによりGWT1遺伝子を欠失した $\Delta$ gwt1株を得た。

#### 【0032】

##### (3)GWT1発現細胞の作製

$\Delta$ gwt1株を、YPD培地(Yeast extract-Polypeptone-Dextrose培地)にて、30℃で振とう培養し、対数増殖後期の時点で集菌した。洗浄後、酢酸リチウム法 (YEAST MAKER™ Yeast Transformation System (Clontech社製)) によりGWT1発現プラスミドを $\Delta$ gwt1株に導入した。SD(ura-)培地で30℃、2日間培養することによりGWT1遺伝子を過剰発現させた $\Delta$ gwt1株を得た。

#### 【0033】

##### (4)膜画分の調製

*S. cerevisiae* 野生株、GWT1遺伝子を欠失した $\Delta$ gwt1株、あるいは $\Delta$ gwt1株にGWT1過剰発現プラスミドを導入した株を、100 mlのYPD培地にて24℃で振とう培養し、対数増殖中期 (OD<sub>600</sub>=1～3) の時点で集菌した。菌体をTM buffer (50 mM T

ris-HCl, pH7.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>)で洗浄した後、2 mlのTM buffer + protease inhibitor (Complete<sup>TM</sup> (Roche社製) 1 tablet / 25 ml)にて懸濁し、1.5 mlのガラスビーズを加えた。これを30秒間ボルテックスして30秒間氷上に置く操作を10回繰り返すことにより菌体を破碎した。菌体破碎液を新しいチューブに移し、4℃で1000g、5分間遠心してガラスビーズおよび未破碎の菌体を沈殿させた。上清を別のチューブにとり、4℃で13,000g, 20分間遠心することによりオルガネラを含む膜画分(Total membrane fraction)を沈殿させ、膜画分とした。

#### 【0034】

##### (5) アシル化されたGPIの検出

GPI生合成反応は、N-acetyl-glucosaminyl-phosphatidylinositol (GlcNAc-PI)が脱アセチル化されることによりGlucosaminyl-phosphatidylinositol (GlcN-PI)を生じ、これにアシル基が付加することによりGlucosaminyl-acylphosphatidylinositol (GlcN-(acyl)PI)へと進むことが知られている(図1)。そこで、Gwt1タンパク質がこのアシル基転移反応に関わっているかを以下の方法によって調べた。

#### 【0035】

調製した膜画分(300 μg protein)を50 mM Tris-HCl, pH7.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM Coenzyme A, 21 μg/ml tunicamycin, 10 μM nikkomycin Z, 0.5 mM Dithiothreitolに対して希釈し全量を 140 μlに合わせ、反応液とした。これを24℃で15分保温した後、15 μCiのUDP-[<sup>14</sup>C]GlcNAcをチューブに添加した。24℃にて1時間保温した後、1 mlのクロロホルム:メタノール(1:2)を添加し攪拌することにより反応を止めて、脂質を抽出した。乾燥させた脂質をブタノール抽出により脱塩し、薄層クロマトグラフィー(HCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/1M NH<sub>4</sub>OH(10:10:3))により、アシル化されたGPI (GlcN-(acyl)PI)、アシル化されていないGPI (GlcN-PI)、アシル化も脱アセチル化もされていないGPI (GlcNAc-PI)を分離し、オートラジオグラフィーにより各スポットを検出した。

#### 【0036】

その結果、図2に示すように、野生株ではアシル化されたGPIのスポットが検出されたのに対し、GWT1遺伝子を破壊した株(Δgwt1)ではアシル化GPIのスポ

ットは全く検出されなかった。また、 $\Delta gwt1$ 株にGWT1遺伝子を導入した株では、アシル化GPIのスポットが検出され、アシル化能が回復していた。以上のことより、Gwt1タンパク質がGPIへのアシル基転移反応を触媒する酵素であることが示された。

#### 【0037】

以上の結果より、本GPI合成酵素活性測定系にGWT1遺伝子産物の活性を阻害活性を有する化合物が含まれていれば、アシル化したGlcN-(acyl)PIのスポットの強度が減弱あるいは消失すると考えられ、GlcN-(acyl)PIのスポットの強度を指標としてGWT1遺伝子産物の酵素活性を阻害する化合物、更には真菌の細胞壁合成を阻害する化合物をスクリーニングすることが可能であると考えられた。

#### 【0038】

##### 【発明の効果】

GPIアンカー蛋白質の真菌細胞壁への輸送を阻害する化合物が、簡単なアシル基転移活性測定によりスクリーニング可能となった。

#### 【0039】

##### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Method for a screening of an inhibitor of GWT1 gene product

<130>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1



&lt;211&gt; 1497

&lt;212&gt; DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1494)

&lt;400&gt; 1

```
atg gca aca gta cat cag aag aat atg tcg act tta aaa cag aga aaa 48
Met Ala Thr Val His Gln Lys Asn Met Ser Thr Leu Lys Gln Arg Lys
  1           5           10           15
gag gac ttt gtg aca ggg ctc aat ggc ggt tct ata aca gaa att aac 96
Glu Asp Phe Val Thr Gly Leu Asn Gly Gly Ser Ile Thr Glu Ile Asn
          20           25           30
gca gtg aca tca att gct ttg gta act tac ata tca tgg aac tta ttg 144
Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu Val Thr Tyr Ile Ser Trp Asn Leu Leu
          35           40           45
aaa aat tcc aac ctt atg cct cct ggc att tcc agc gtg caa tac ata 192
Lys Asn Ser Asn Leu Met Pro Pro Gly Ile Ser Ser Val Gln Tyr Ile
          50           55           60
att gat ttt gca ttg aac tgg gtt gct ttg ctt cta tct att act att 240
Ile Asp Phe Ala Leu Asn Trp Val Ala Leu Leu Leu Ser Ile Thr Ile
          65           70           75           80
tat gct agt gaa cca tac ctt cta aac acg cta ata ctg tta cct tgt 288
Tyr Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Leu Asn Thr Leu Ile Leu Leu Pro Cys
          85           90           95
ttg ctc gca ttc ata tat gga aaa ttt act agc tcg agt aaa cct tct 336
Leu Leu Ala Phe Ile Tyr Gly Lys Phe Thr Ser Ser Ser Lys Pro Ser
```

100	105	110	
aat cca ata tac aat aaa aaa aaa atg att aca cag cgg ttc caa cta			384
Asn Pro Ile Tyr Asn Lys Lys Lys Met Ile Thr Gln Arg Phe Gln Leu			
115	120	125	
gaa aaa aag ccg tat att act gcg tat cgt ggt ggg atg ctt att ctg			432
Glu Lys Lys Pro Tyr Ile Thr Ala Tyr Arg Gly Gly Met Leu Ile Leu			
130	135	140	
act gct att gcc atc ttg gct gta gat ttt cca att ttc cca agg agg			480
Thr Ala Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro Arg Arg			
145	150	155	160
ttt gcc aag gtg gaa act tgg ggg aca tcc ctg atg gat ctt ggt gta			528
Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val			
165	170	175	
gga tca ttc gtt ttc agt aac ggt att gtt tct tct agg gca ctg ttg			576
Gly Ser Phe Val Phe Ser Asn Gly Ile Val Ser Ser Arg Ala Leu Leu			
180	185	190	
aaa aac cta agc ttg aag agt aaa ccc agc ttc tta aaa aat gca ttt			624
Lys Asn Leu Ser Leu Lys Ser Lys Pro Ser Phe Leu Lys Asn Ala Phe			
195	200	205	
aat gcc tta aaa tca gga gga act cta ttg ttc cta gga ttg ctg agg			672
Asn Ala Leu Lys Ser Gly Gly Thr Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Arg			
210	215	220	
ttg ttt ttt gta aaa aat ttg gaa tat caa gaa cat gtc aca gaa tat			720
Leu Phe Phe Val Lys Asn Leu Glu Tyr Gln Glu His Val Thr Glu Tyr			
225	230	235	240
ggg gtt cat tgg aat ttt ttt atc acc cta tca ttg ttg cca ctt gta			768
Gly Val His Trp Asn Phe Phe Ile Thr Leu Ser Leu Leu Pro Leu Val			
245	250	255	
ttg acc ttt att gat ccc gtc aca aga atg gtt cca cgc tgc tca att			816

Leu Thr Phe Ile Asp Pro Val Thr Arg Met Val Pro Arg Cys Ser Ile  
260 265 270  
gca ata ttc att tca tgc att tat gaa tgg cta ctt tta aag gac gat 864  
Ala Ile Phe Ile Ser Cys Ile Tyr Glu Trp Leu Leu Leu Lys Asp Asp  
275 280 285  
cgc act tta aac ttt tta att ttg gct gat aga aat tgt ttc ttc agt 912  
Arg Thr Leu Asn Phe Leu Ile Leu Ala Asp Arg Asn Cys Phe Phe Ser  
290 295 300  
gct aat aga gaa ggc atc ttc tca ttt cta ggt tat tgc tcg att ttt 960  
Ala Asn Arg Glu Gly Ile Phe Ser Phe Leu Gly Tyr Cys Ser Ile Phe  
305 310 315 320  
ctt tgg ggc caa aac acg gga ttt tac ttg ttg gga aat aaa cca act 1008  
Leu Trp Gly Gln Asn Thr Gly Phe Tyr Leu Leu Gly Asn Lys Pro Thr  
325 330 335  
tta aac aat ctt tat aag cct tct acg caa gac gta gtt gca gca tca 1056  
Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Gln Asp Val Val Ala Ala Ser  
340 345 350  
aag aag tct tcg act tgg gac tat tgg act tca gta acc cca tta agt 1104  
Lys Lys Ser Ser Thr Trp Asp Tyr Trp Thr Ser Val Thr Pro Leu Ser  
355 360 365  
ggc ctc tgt ata tgg agt aca att ttt ctt gtt atc agc cag ttg gtt 1152  
Gly Leu Cys Ile Trp Ser Thr Ile Phe Leu Val Ile Ser Gln Leu Val  
370 375 380  
ttt caa tac cat cct tat agt gtt tca aga agg ttt gct aac tta cca 1200  
Phe Gln Tyr His Pro Tyr Ser Val Ser Arg Arg Phe Ala Asn Leu Pro  
385 390 395 400  
tat act ttg tgg gtc att act tat aat tta cta ttt ttg act ggg tac 1248  
Tyr Thr Leu Trp Val Ile Thr Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Thr Gly Tyr  
405 410 415

tgc ttg act gac aaa att ttc ggt aat tct tcg gaa tat tat aaa gtt 1296  
 Cys Leu Thr Asp Lys Ile Phe Gly Asn Ser Ser Glu Tyr Tyr Lys Val  
           420                    425                    430  
 gcc gaa tgc ttg gaa tca atc aac tcc aat ggg ttg ttt tta ttt ttg 1344  
 Ala Glu Cys Leu Glu Ser Ile Asn Ser Asn Gly Leu Phe Leu Phe Leu  
           435                    440                    445  
 ttg gca aat gtc tct act ggt tta gtc aat atg tct atg gtc acg ata 1392  
 Leu Ala Asn Val Ser Thr Gly Leu Val Asn Met Ser Met Val Thr Ile  
           450                    455                    460  
 gat tct tca ccc tta aaa tca ttc ctg gtt ttg ttg gca tac tgc tca 1440  
 Asp Ser Ser Pro Leu Lys Ser Phe Leu Val Leu Leu Ala Tyr Cys Ser  
 465                    470                    475                    480  
 ttc ata gct gtc ata tcg gtt ttc ttg tat aga aaa aga ata ttc att 1488  
 Phe Ile Ala Val Ile Ser Val Phe Leu Tyr Arg Lys Arg Ile Phe Ile  
                     485                    490                    495  
 aag cta taa 1497  
 Lys Leu

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 498

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 2

Met Ala Thr Val His Gln Lys Asn Met Ser Thr Leu Lys Gln Arg Lys  
   1                    5                    10                    15  
 Glu Asp Phe Val Thr Gly Leu Asn Gly Gly Ser Ile Thr Glu Ile Asn  
           20                    25                    30

Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu Val Thr Tyr Ile Ser Trp Asn Leu Leu  
35 40 45  
Lys Asn Ser Asn Leu Met Pro Pro Gly Ile Ser Ser Val Gln Tyr Ile  
50 55 60  
Ile Asp Phe Ala Leu Asn Trp Val Ala Leu Leu Leu Ser Ile Thr Ile  
65 70 75 80  
Tyr Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Leu Asn Thr Leu Ile Leu Leu Pro Cys  
85 90 95  
Leu Leu Ala Phe Ile Tyr Gly Lys Phe Thr Ser Ser Ser Lys Pro Ser  
100 105 110  
Asn Pro Ile Tyr Asn Lys Lys Lys Met Ile Thr Gln Arg Phe Gln Leu  
115 120 125  
Glu Lys Lys Pro Tyr Ile Thr Ala Tyr Arg Gly Gly Met Leu Ile Leu  
130 135 140  
Thr Ala Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro Arg Arg  
145 150 155 160  
Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val  
165 170 175  
Gly Ser Phe Val Phe Ser Asn Gly Ile Val Ser Ser Arg Ala Leu Leu  
180 185 190  
Lys Asn Leu Ser Leu Lys Ser Lys Pro Ser Phe Leu Lys Asn Ala Phe  
195 200 205  
Asn Ala Leu Lys Ser Gly Gly Thr Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Arg  
210 215 220  
Leu Phe Phe Val Lys Asn Leu Glu Tyr Gln Glu His Val Thr Glu Tyr  
225 230 235 240  
Gly Val His Trp Asn Phe Phe Ile Thr Leu Ser Leu Leu Pro Leu Val  
245 250 255  
Leu Thr Phe Ile Asp Pro Val Thr Arg Met Val Pro Arg Cys Ser Ile

260	265	270
Ala Ile Phe Ile Ser Cys Ile Tyr Glu Trp Leu Leu Leu Lys Asp Asp		
275	280	285
Arg Thr Leu Asn Phe Leu Ile Leu Ala Asp Arg Asn Cys Phe Phe Ser		
290	295	300
Ala Asn Arg Glu Gly Ile Phe Ser Phe Leu Gly Tyr Cys Ser Ile Phe		
305	310	315
Leu Trp Gly Gln Asn Thr Gly Phe Tyr Leu Leu Gly Asn Lys Pro Thr		
325	330	335
Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Gln Asp Val Val Ala Ala Ser		
340	345	350
Lys Lys Ser Ser Thr Trp Asp Tyr Trp Thr Ser Val Thr Pro Leu Ser		
355	360	365
Gly Leu Cys Ile Trp Ser Thr Ile Phe Leu Val Ile Ser Gln Leu Val		
370	375	380
Phe Gln Tyr His Pro Tyr Ser Val Ser Arg Arg Phe Ala Asn Leu Pro		
385	390	395
Tyr Thr Leu Trp Val Ile Thr Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Thr Gly Tyr		
405	410	415
Cys Leu Thr Asp Lys Ile Phe Gly Asn Ser Ser Glu Tyr Tyr Lys Val		
420	425	430
Ala Glu Cys Leu Glu Ser Ile Asn Ser Asn Gly Leu Phe Leu Phe Leu		
435	440	445
Leu Ala Asn Val Ser Thr Gly Leu Val Asn Met Ser Met Val Thr Ile		
450	455	460
Asp Ser Ser Pro Leu Lys Ser Phe Leu Val Leu Leu Ala Tyr Cys Ser		
465	470	475
Phe Ile Ala Val Ile Ser Val Phe Leu Tyr Arg Lys Arg Ile Phe Ile		
485	490	495

Lys Leu

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1458

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1455)

&lt;400&gt; 3

atg tca tcg tct tta aaa caa ttg aaa gaa caa ttt gtc tca gat ttg	48
Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu	
1 5 10 15	
act ggt ggc aca att gaa gaa att tat gct gta acc agt ata gca tta	96
Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu	
20 25 30	
tca tct tat ttg tcc ttt aga ttg ttg aaa aag tct ctt ggt gat tta	144
Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu	
35 40 45	
gct ttg att tac gac tac att ctt aat gtg ttg aca att cta gca tcc	192
Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser	
50 55 60	
att act gtt tat agc aac agc cct tct tat ttg cat tat ttt att gtt	240
Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val	
65 70 75 80	
att cca tca tta gtt ata tat cta gtg aat tac cat gtt gag aaa cca	288

Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro	
85	90
tct tca ccc cat aga caa aat gat aca aaa gaa gat aaa tcg gac gaa	336
Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu	
100	110
cta ttg ccg aga aaa caa ttt ata aca gcc tat cgt tct caa atg ttg	384
Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu	
115	125
ata att act aat cta gct ata tta gct gtt gat ttt cct att ttc cca	432
Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro	
130	140
aga aga ttt gcc aaa gtg gaa aca tgg ggc acg tca atg atg gat tta	480
Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu	
145	160
gga gtt ggg tcg ttt gtg ttc tcc atg ggg ttg gct aat tct cga caa	528
Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln	
165	175
ttg atc aag aac cac acc gac aac tac aaa ttt agt tgg aag agt tat	576
Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr	
180	190
ttg aaa aca atc aag cag aac ttt atc aag tca gtg cct ata ctt gtt	624
Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val	
195	205
tta gga gct att cgt ttt gtt agt gtt aag caa ttg gac tat cag gaa	672
Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu	
210	220
cac gaa aca gag tat gga atc cat tgg aat ttt ttc ttc aca tta ggg	720
His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly	
225	240



ttc ttg cca att gta ttg gga ata tta gac ccg gtg ttg aat ttg gtt	768
Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val	
245 250 255	
cca cgc ttc ata ata gga att ggt atc tca att gct tat gag gta gcg	816
Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Ala Tyr Glu Val Ala	
260 265 270	
ttg aat aag act ggt ttg ttg aag ttc att ttg agc agc gaa aac aga	864
Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg	
275 280 285	
ctt gaa tct ctc atc acc atg aat aaa gaa ggt att ttt tcg ttt att	912
Leu Glu Ser Leu Ile Thr Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile	
290 295 300	
gga tat ctt tgt att ttt ata att ggt cag tct ttt ggg tca ttt gtt	960
Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val	
305 310 315 320	
tta aca ggc tac aaa aca aag aac aac tta ata acc att agc aaa att	1008
Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile	
325 330 335	
cgt att tca aaa aaa caa cac aag aaa gag ctg ctg ctg ttt ttc tca	1056
Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser	
340 345 350	
gtc gcc act act cag gga tta tat ttg gca tgt atc ttc tat cac tta	1104
Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu	
355 360 365	
gct ttc agt ttg ttc atc agc aac tta tca ttc ttg caa cca att tca	1152
Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser	
370 375 380	
aga cga ttg gcc aat ttc ccc tac gtc atg tgg gtc gtt tcg tac aat	1200
Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn	

385                      390                      395                      400  
gct acg ttt tta tta tgt tat gac tta att gaa aaa ttt atc ccg ggg 1248  
Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly  
                    405                      410                      415  
aac ctt act tct act gta ttg gac tct att aat aac aat ggt tta ttt 1296  
Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe  
                    420                      425                      430  
atc ttc ttg gtc agc aat tta tta aca ggg ttt att aac atg tcc atc 1344  
Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile  
                    435                      440                      445  
aac act ttg gaa act agc aat aaa atg gca gtg att atc ttg att ggc 1392  
Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly  
                    450                      455                      460  
tat agt ctt act tgg aca ttg ctc gcc tta tat ttg gat aag agg aag 1440  
Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys  
465                      470                      475                      480  
atc tac atc aag ctt tag 1458  
Ile Tyr Ile Lys Leu  
                    485

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 485

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 4

Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu

1

5

10

15

Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu  
20 25 30  
Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu  
35 40 45  
Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser  
50 55 60  
Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val  
65 70 75 80  
Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro  
85 90 95  
Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu  
100 105 110  
Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu  
115 120 125  
Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro  
130 135 140  
Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu  
145 150 155 160  
Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln  
165 170 175  
Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr  
180 185 190  
Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val  
195 200 205  
Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu  
210 215 220  
His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly  
225 230 235 240  
Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val

245	250	255
Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Ala Tyr Glu Val Ala		
260	265	270
Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg		
275	280	285
Leu Glu Ser Leu Ile Thr Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile		
290	295	300
Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val		
305	310	315
320		
Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile		
325	330	335
Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser		
340	345	350
Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu		
355	360	365
Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser		
370	375	380
Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn		
385	390	395
400		
Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly		
405	410	415
Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe		
420	425	430
Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile		
435	440	445
Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly		
450	455	460
Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys		
465	470	475
480		

Ile Tyr Ile Lys Leu

485

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1458

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1455)

&lt;400&gt; 5

atg tca tcg tct tta aaa caa ttg aaa gaa caa ttt gtc tca gat ttg	48
Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu	
1 5 10 15	
act ggt ggc aca att gaa gaa att tat gct gta acc agt ata gca tta	96
Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu	
20 25 30	
tca tct tat ttg tcc ttt aga ttg ttg aaa aag tct ctt ggt gat tta	144
Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu	
35 40 45	
gct ttg att tac gac tac att ctt aat gtg ttg aca att cta gca tcc	192
Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser	
50 55 60	
att act gtt tat agc aac agc cct tct tat ttg cat tat ttt att gtt	240
Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val	
65 70 75 80	

att cca tca tta gtt ata tat cta gtg aat tac cat gtt gag aaa cca 288  
Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro  
85 90 95

tct tca ccc cat aga caa aat gat aca aaa gaa gat aaa tcg gac gaa 336  
Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu  
100 105 110

cta ttg ccg aga aaa caa ttt ata aca gcc tat cgt tct caa atg ttg 384  
Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu  
115 120 125

ata att act aat cta gct ata tta gct gtt gat ttt cct att ttc cca 432  
Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro  
130 135 140

aga aga ttt gcc aaa gtg gaa aca tgg ggc acg tca atg atg gat tta 480  
Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu  
145 150 155 160

gga gtt ggg tcg ttt gtg ttc tcc atg ggg ttg gct aat tct cga caa 528  
Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln  
165 170 175

ttg atc aag aac cac acc gac aat tac aaa ttt agt tgg aag agt tat 576  
Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr  
180 185 190

ttg aaa aca atc aag cag aac ttt atc aag tca gtg cct ata ctt gtt 624  
Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val  
195 200 205

tta gga gct att cgt ttt gtt agt gtt aag caa ttg gac tat cag gaa 672  
Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu  
210 215 220

cac gaa aca gag tat gga atc cat tgg aat ttt ttc ttc aca tta ggg 720  
His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly

225	230	235	240	
ttc ttg cca att gta ttg gga ata tta gac ccg gtg ttg aat ttg gtt				768
Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val				
245	250	255		
cca cgc ttc ata ata gga att ggt atc tca att ggt tat gag gta gcg				816
Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Gly Tyr Glu Val Ala				
260	265	270		
ttg aat aag act ggt ttg ttg aag ttc att ttg agc agc gaa aac aga				864
Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg				
275	280	285		
ctt gaa tct ctc atc gcc atg aat aaa gaa ggt att ttt tcg ttt att				912
Leu Glu Ser Leu Ile Ala Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile				
290	295	300		
gga tat ctt tgt att ttt ata att ggt cag tct ttt ggg tca ttt gtt				960
Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val				
305	310	315	320	
tta aca ggc tac aaa aca aag aac aac tta ata acc att agc aaa att				1008
Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile				
325	330	335		
cgt att tca aaa aaa caa cac aag aaa gag ctg ctg ctg ttt ttc tca				1056
Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser				
340	345	350		
gtc gcc act act cag gga tta tat ttg gca tgt atc ttc tat cac tta				1104
Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu				
355	360	365		
gct ttc agt ttg ttc atc agc aac tta tca ttc ttg caa cca att tca				1152
Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser				
370	375	380		
aga cga ttg gcc aat ttc ccc tac gtc atg tgg gtc gtt tcg tac aat				1200

Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn  
 385 390 395 400  
 gct acg ttt tta tta tgt tat gac tta att gaa aaa ttt atc ccg ggg 1248  
 Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly  
 405 410 415  
 aac ctt act tct act gta ttg gac tct att aat aac aat ggt tta ttt 1296  
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe  
 420 425 430  
 atc ttc ttg gtc agc aat tta tta aca ggg ttt att aac atg tcc atc 1344  
 Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile  
 435 440 445  
 aac act ttg gaa act agc aat aaa atg gca gtg att atc ttg att ggc 1392  
 Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly  
 450 455 460  
 tat agt ctt act tgg aca ttg ctc gcc tta tat ttg gat aag agg aag 1440  
 Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys  
 465 470 475 480  
 atc tac atc aag ctt tag 1458  
 Ile Tyr Ile Lys Leu  
 485

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 485

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 6

Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu



1	5	10	15
Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu			
20	25	30	
Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu			
35	40	45	
Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser			
50	55	60	
Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val			
65	70	75	80
Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro			
85	90	95	
Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu			
100	105	110	
Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu			
115	120	125	
Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro			
130	135	140	
Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu			
145	150	155	160
Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln			
165	170	175	
Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr			
180	185	190	
Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val			
195	200	205	
Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu			
210	215	220	
His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly			
225	230	235	240

Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val  
245 250 255

Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Gly Tyr Glu Val Ala  
260 265 270

Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg  
275 280 285

Leu Glu Ser Leu Ile Ala Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile  
290 295 300

Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val  
305 310 315 320

Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile  
325 330 335

Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser  
340 345 350

Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu  
355 360 365

Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser  
370 375 380

Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn  
385 390 395 400

Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly  
405 410 415

Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe  
420 425 430

Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile  
435 440 445

Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly  
450 455 460

Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys

465                      470                      475                      480

Ile Tyr Ile Lys Leu

485

<210> 7

<211> 1380

<212> DNA

<213> Schizosaccharomyces pombe

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1380)

<400> 7

atg tca tac aaa ttg gaa aaa gaa gca ttt gtc tca aac ctg acg ggt 48

Met Ser Tyr Lys Leu Glu Lys Glu Ala Phe Val Ser Asn Leu Thr Gly

1                      5                      10                      15

tca agt tcc att gag aca tgt ggc ttg tta tta ata gga att gct tgc 96

Ser Ser Ser Ile Glu Thr Cys Gly Leu Leu Leu Ile Gly Ile Ala Cys

20                      25                      30

aac gtt ttg tgg gta aac atg act gcg aga aac atc tta ccc aaa ggg 144

Asn Val Leu Trp Val Asn Met Thr Ala Arg Asn Ile Leu Pro Lys Gly

35                      40                      45

aat ctt ggg ttt ctt gtt gag ttt ttc atc ttt tgc tta att cca tta 192

Asn Leu Gly Phe Leu Val Glu Phe Phe Ile Phe Cys Leu Ile Pro Leu

50                      55                      60

ttt gtc att tac gtt tca tcg aaa gtt ggc gtt ttc act ctt tgc ata 240

Phe Val Ile Tyr Val Ser Ser Lys Val Gly Val Phe Thr Leu Cys Ile

65                      70                      75                      80

gcc tct ttt ttg cct tcc ttc gtc ctt cat gtt ata agt cca att aat	288
Ala Ser Phe Leu Pro Ser Phe Val Leu His Val Ile Ser Pro Ile Asn	
85 90 95	
tgg gat gtg ctg aga aga aaa cct ggt tgt tgt ctt act aaa aaa aat	336
Trp Asp Val Leu Arg Arg Lys Pro Gly Cys Cys Leu Thr Lys Lys Asn	
100 105 110	
gaa aat act ttt gat cga cga att gct gga gtc aca ttt tat cgt tct	384
Glu Asn Thr Phe Asp Arg Arg Ile Ala Gly Val Thr Phe Tyr Arg Ser	
115 120 125	
caa atg atg ttg gtt act gtc act tgc atc ctg gcc gtt gac ttt acc	432
Gln Met Met Leu Val Thr Val Thr Cys Ile Leu Ala Val Asp Phe Thr	
130 135 140	
ctt ttc ccg agg aga tat gcc aaa gtt gaa acc tgg gga aca tca ctg	480
Leu Phe Pro Arg Arg Tyr Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu	
145 150 155 160	
atg gat ctt ggt gtt gga tct ttc atg ttt tct tca ggt act gtg gct	528
Met Asp Leu Gly Val Gly Ser Phe Met Phe Ser Ser Gly Thr Val Ala	
165 170 175	
gga cgg aaa aat gac att aaa aaa cca aat gcg ttt aaa aat gta ttg	576
Gly Arg Lys Asn Asp Ile Lys Lys Pro Asn Ala Phe Lys Asn Val Leu	
180 185 190	
tgg aat tct ttc atc ctt ttg att tta gga ttt gcg cgc atg ttt tta	624
Trp Asn Ser Phe Ile Leu Leu Ile Leu Gly Phe Ala Arg Met Phe Leu	
195 200 205	
acg aaa agc atc aat tac caa gaa cat gta agc gaa tat ggc atg cat	672
Thr Lys Ser Ile Asn Tyr Gln Glu His Val Ser Glu Tyr Gly Met His	
210 215 220	
tgg aac ttt ttt ttc acc cta ggt ttc atg gct ctt ggc gta ttt ttt	720
Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Phe Met Ala Leu Gly Val Phe Phe	

225	230	235	240	
ttt cgt cgt tct tta aaa aaa gtc tcc tat ttt aat tta gca acc ttc				768
Phe Arg Arg Ser Leu Lys Lys Val Ser Tyr Phe Asn Leu Ala Thr Phe				
245	250	255		
att act ctt ctt cat cat tgt ttg ctt gtt tta acc cct ttc caa aaa				816
Ile Thr Leu Leu His His Cys Leu Leu Val Leu Thr Pro Phe Gln Lys				
260	265	270		
tgg gca cta tcc gcc ccc aga aca aat att ttg gct cag aat aga gag				864
Trp Ala Leu Ser Ala Pro Arg Thr Asn Ile Leu Ala Gln Asn Arg Glu				
275	280	285		
ggt att gct tct ctt ccc gga tac att gct att tac ttt tat gga atg				912
Gly Ile Ala Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Ile Tyr Phe Tyr Gly Met				
290	295	300		
tat acc ggt agt gta gtt ttg gct gat cga cct cta atg tat act aga				960
Tyr Thr Gly Ser Val Val Leu Ala Asp Arg Pro Leu Met Tyr Thr Arg				
305	310	315	320	
gct gag tcg tgg aag cgc ttt caa cgt cta tta ttc ccg cta tgc att				1008
Ala Glu Ser Trp Lys Arg Phe Gln Arg Leu Leu Phe Pro Leu Cys Ile				
325	330	335		
ttg tta gtg ttg tat ctt gtg tct aac ttt ttg tca gtt ggt gtt tct				1056
Leu Leu Val Leu Tyr Leu Val Ser Asn Phe Leu Ser Val Gly Val Ser				
340	345	350		
cgc cga ctt gct aat acg cct tat gtt gcg aat gtt gcc ttt atc aat				1104
Arg Arg Leu Ala Asn Thr Pro Tyr Val Ala Asn Val Ala Phe Ile Asn				
355	360	365		
atg ttt ttt ctt act ata tac ata ctt att gat gcc tat tta ttc cca				1152
Met Phe Phe Leu Thr Ile Tyr Ile Leu Ile Asp Ala Tyr Leu Phe Pro				
370	375	380		
tct tct gtg cca tat gga agt cgc gtc ccc aaa ctg ctt gaa gat gcc				1200

Ser Ser Val Pro Tyr Gly Ser Arg Val Pro Lys Leu Leu Glu Asp Ala  
 385 390 395 400  
 aat aat aat ggc ttg ttg gtg ttt ttg att gct aac gtt tta aca gga 1248  
 Asn Asn Asn Gly Leu Leu Val Phe Leu Ile Ala Asn Val Leu Thr Gly  
 405 410 415  
 gta gtt aat tta tcg ttc gac acc ctt cat tct agc aat gca aaa ggc 1296  
 Val Val Asn Leu Ser Phe Asp Thr Leu His Ser Ser Asn Ala Lys Gly  
 420 425 430  
 ttg aca atc atg act atg tat ctt ttt att att tgc tat atg gca cat 1344  
 Leu Thr Ile Met Thr Met Tyr Leu Phe Ile Ile Cys Tyr Met Ala His  
 435 440 445  
 tgg ctt gct caa cac gga att cgt ttt cgc ctt tag 1380  
 Trp Leu Ala Gln His Gly Ile Arg Phe Arg Leu  
 450 455 460

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 459

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Schizosaccharomyces pombe

&lt;400&gt; 8

Met Ser Tyr Lys Leu Glu Lys Glu Ala Phe Val Ser Asn Leu Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Ser Ile Glu Thr Cys Gly Leu Leu Leu Ile Gly Ile Ala Cys  
 20 25 30  
 Asn Val Leu Trp Val Asn Met Thr Ala Arg Asn Ile Leu Pro Lys Gly  
 35 40 45  
 Asn Leu Gly Phe Leu Val Glu Phe Phe Ile Phe Cys Leu Ile Pro Leu

50                      55                      60  
Phe Val Ile Tyr Val Ser Ser Lys Val Gly Val Phe Thr Leu Cys Ile  
65                      70                      75                      80  
Ala Ser Phe Leu Pro Ser Phe Val Leu His Val Ile Ser Pro Ile Asn  
85                      90                      95  
Trp Asp Val Leu Arg Arg Lys Pro Gly Cys Cys Leu Thr Lys Lys Asn  
100                      105                      110  
Glu Asn Thr Phe Asp Arg Arg Ile Ala Gly Val Thr Phe Tyr Arg Ser  
115                      120                      125  
Gln Met Met Leu Val Thr Val Thr Cys Ile Leu Ala Val Asp Phe Thr  
130                      135                      140  
Leu Phe Pro Arg Arg Tyr Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu  
145                      150                      155                      160  
Met Asp Leu Gly Val Gly Ser Phe Met Phe Ser Ser Gly Thr Val Ala  
165                      170                      175  
Gly Arg Lys Asn Asp Ile Lys Lys Pro Asn Ala Phe Lys Asn Val Leu  
180                      185                      190  
Trp Asn Ser Phe Ile Leu Leu Ile Leu Gly Phe Ala Arg Met Phe Leu  
195                      200                      205  
Thr Lys Ser Ile Asn Tyr Gln Glu His Val Ser Glu Tyr Gly Met His  
210                      215                      220  
Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Phe Met Ala Leu Gly Val Phe Phe  
225                      230                      235                      240  
Phe Arg Arg Ser Leu Lys Lys Val Ser Tyr Phe Asn Leu Ala Thr Phe  
245                      250                      255  
Ile Thr Leu Leu His His Cys Leu Leu Val Leu Thr Pro Phe Gln Lys  
260                      265                      270  
Trp Ala Leu Ser Ala Pro Arg Thr Asn Ile Leu Ala Gln Asn Arg Glu  
275                      280                      285

Gly Ile Ala Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Ile Tyr Phe Tyr Gly Met  
290 295 300  
Tyr Thr Gly Ser Val Val Leu Ala Asp Arg Pro Leu Met Tyr Thr Arg  
305 310 315 320  
Ala Glu Ser Trp Lys Arg Phe Gln Arg Leu Leu Phe Pro Leu Cys Ile  
325 330 335  
Leu Leu Val Leu Tyr Leu Val Ser Asn Phe Leu Ser Val Gly Val Ser  
340 345 350  
Arg Arg Leu Ala Asn Thr Pro Tyr Val Ala Asn Val Ala Phe Ile Asn  
355 360 365  
Met Phe Phe Leu Thr Ile Tyr Ile Leu Ile Asp Ala Tyr Leu Phe Pro  
370 375 380  
Ser Ser Val Pro Tyr Gly Ser Arg Val Pro Lys Leu Leu Glu Asp Ala  
385 390 395 400  
Asn Asn Asn Gly Leu Leu Val Phe Leu Ile Ala Asn Val Leu Thr Gly  
405 410 415  
Val Val Asn Leu Ser Phe Asp Thr Leu His Ser Ser Asn Ala Lys Gly  
420 425 430  
Leu Thr Ile Met Thr Met Tyr Leu Phe Ile Ile Cys Tyr Met Ala His  
435 440 445  
Trp Leu Ala Gln His Gly Ile Arg Phe Arg Leu  
450 455

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1576

&lt;212&gt; DNA

<213> *Aspergillus fumigatus*



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (31)..(1536)

&lt;400&gt; 9

aaggtgcaaa tcccgcggca ttgagtcaag atg gat cca gat tat aaa gct cgc	54
Met Asp Pro Asp Tyr Lys Ala Arg	
1 5	
aaa gag gcc ttt gtc tca ggt ctt gca gga gga agc atc ctg gaa atc	102
Lys Glu Ala Phe Val Ser Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ile Leu Glu Ile	
10 15 20	
aac gcc gtc acc ttg gtt gct tcg gta tcc gtt ttt ctg tgg tca att	150
Asn Ala Val Thr Leu Val Ala Ser Val Ser Val Phe Leu Trp Ser Ile	
25 30 35 40	
cta caa tct cgc cta tcc ttt ttc aca ccc tac agc gcc gct gcc ctt	198
Leu Gln Ser Arg Leu Ser Phe Phe Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Ala Leu	
45 50 55	
ctc gtt gat ttc ctg ctc aat gta cta gct atc ttg ttc gca acc act	246
Leu Val Asp Phe Leu Leu Asn Val Leu Ala Ile Leu Phe Ala Thr Thr	
60 65 70	
tta tac tct tcg gcg cct ctt ctt ctc aat ctc ctt cta ata tct ccc	294
Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Leu Leu Leu Asn Leu Leu Leu Ile Ser Pro	
75 80 85	
gct ctg ctg ata ctc ctc tct acg aaa cgt cct cgg acc ccc gtc aaa	342
Ala Leu Leu Ile Leu Leu Ser Thr Lys Arg Pro Arg Thr Pro Val Lys	
90 95 100	
gcg aaa cct cct cgc cag tcc gct aga gct ggg aaa gat gac tcg aaa	390
Ala Lys Pro Pro Arg Gln Ser Ala Arg Ala Gly Lys Asp Asp Ser Lys	
105 110 115 120	

cat gcg aca gcc ttg cca gag tct cta ccc att cat cca ttt ctc acg 438  
His Ala Thr Ala Leu Pro Glu Ser Leu Pro Ile His Pro Phe Leu Thr  
125 130 135

aca tat cgc gcc gcc atg atg gtt atc acg tgc atc gct atc ttg gct 486  
Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Val Ile Thr Cys Ile Ala Ile Leu Ala  
140 145 150

gtg gat ttt cgc att ttt cct cgc cga ttc gcc aag gta gaa aac tgg 534  
Val Asp Phe Arg Ile Phe Pro Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Asn Trp  
155 160 165

ggt aca tca ctc atg gat ctg ggc gtt gga tcg ttt gtc ttt tcg ggc 582  
Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Gly  
170 175 180

gga gta gta tcc gct cgc tca cta ctc aag agc agg acc aat ggc tct 630  
Gly Val Val Ser Ala Arg Ser Leu Leu Lys Ser Arg Thr Asn Gly Ser  
185 190 195 200

aaa agg ttg cct ctt gcc aag agg ttg att gcg tcg acg cga cac tct 678  
Lys Arg Leu Pro Leu Ala Lys Arg Leu Ile Ala Ser Thr Arg His Ser  
205 210 215

att cct ctg ctc gtc ctc ggc ctg att cgg cta tac agc gtc aaa ggc 726  
Ile Pro Leu Leu Val Leu Gly Leu Ile Arg Leu Tyr Ser Val Lys Gly  
220 225 230

ttg gac tat gcg gag cac gtc acc gag tac ggc gta cat tgg aac ttc 774  
Leu Asp Tyr Ala Glu His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe  
235 240 245

ttc ttt aca ttg ggt ctt ttg cct ccg ttc gtg gag gtc ttc gac gcc 822  
Phe Phe Thr Leu Gly Leu Leu Pro Pro Phe Val Glu Val Phe Asp Ala  
250 255 260

ttg gct acg atc att ccg tca tac gag gtt ctc tcc gtg ggg atc gcc 870  
Leu Ala Thr Ile Ile Pro Ser Tyr Glu Val Leu Ser Val Gly Ile Ala

265	270	275	280	
gtc ttg tat caa gtt gcc cta gag tca aca gac ttg aaa agc tac atc				918
Val Leu Tyr Gln Val Ala Leu Glu Ser Thr Asp Leu Lys Ser Tyr Ile				
	285	290	295	
ctc gtc tcc cct cgt ggg cca agc tta ctg tcc aag aat cgt gaa ggc				966
Leu Val Ser Pro Arg Gly Pro Ser Leu Leu Ser Lys Asn Arg Glu Gly				
	300	305	310	
gtc ttc tcc ttc tca ggt tat ctc gcg att ttt ctt gct ggt cgt gcg				1014
Val Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Leu Ala Ile Phe Leu Ala Gly Arg Ala				
	315	320	325	
atc ggc att cgg ata atc cct cgc gga act tct ttc tca aga agc cca				1062
Ile Gly Ile Arg Ile Ile Pro Arg Gly Thr Ser Phe Ser Arg Ser Pro				
	330	335	340	
gaa cag gcc agg aga cgg gtc ctg atc agc ctt ggc gtg caa gcg tta				1110
Glu Gln Ala Arg Arg Arg Val Leu Ile Ser Leu Gly Val Gln Ala Leu				
	345	350	355	360
gtg tgg acc act ctt ttt gtg ttg aac tcc act tat gcg atg gga tac				1158
Val Trp Thr Thr Leu Phe Val Leu Asn Ser Thr Tyr Ala Met Gly Tyr				
	365	370	375	
gga gct aat atc cct gtc tcc cgc cgc ctc gct aac atg ccc tat gtc				1206
Gly Ala Asn Ile Pro Val Ser Arg Arg Leu Ala Asn Met Pro Tyr Val				
	380	385	390	
ctt tgg gtt tcg gcg ttc aac acc gcg caa ctg ttt gtg ttc tgc ctg				1254
Leu Trp Val Ser Ala Phe Asn Thr Ala Gln Leu Phe Val Phe Cys Leu				
	395	400	405	
atc gaa aca ctc tgc ttt cct gca gtt cat cgg aca acg act caa gag				1302
Ile Glu Thr Leu Cys Phe Pro Ala Val His Arg Thr Thr Thr Gln Glu				
	410	415	420	
agc gaa tct gag cga gtc gat ttt gct acg agc cga atc atg tcg gcc				1350

Ser Glu Ser Glu Arg Val Asp Phe Ala Thr Ser Arg Ile Met Ser Ala  
 425                      430                      435                      440  
 ttc aat aag aac agt ctc gcg atc ttt ctt ttg gcc aat ctt ctg act    1398  
 Phe Asn Lys Asn Ser Leu Ala Ile Phe Leu Leu Ala Asn Leu Leu Thr  
                     445                      450                      455  
 gga gct gtg aat ctg agc atc tcc aca att gat gct aat aca gcg cag    1446  
 Gly Ala Val Asn Leu Ser Ile Ser Thr Ile Asp Ala Asn Thr Ala Gln  
                     460                      465                      470  
 gcc atc gct gtt ctc att gga tat tca tcc att atc aca ggg gtt gct    1494  
 Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Tyr Ser Ser Ile Ile Thr Gly Val Ala  
                     475                      480                      485  
 cta gca ttg cat cat gcc aat atc aaa gta ctt cct ttc tag            1536  
 : Leu Ala Leu His His Ala Asn Ile Lys Val Leu Pro Phe  
                     490                      495                      500  
 ggtatttacg agcaattggt ggtgtgttga agatatatag                      1576

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 501

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Aspergillus fumigatus

&lt;400&gt; 10

Met Asp Pro Asp Tyr Lys Ala Arg Lys Glu Ala Phe Val Ser Gly Leu  
     1                      5                      10                      15  
 Ala Gly Gly Ser Ile Leu Glu Ile Asn Ala Val Thr Leu Val Ala Ser  
                     20                      25                      30  
 Val Ser Val Phe Leu Trp Ser Ile Leu Gln Ser Arg Leu Ser Phe Phe  
                     35                      40                      45

Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Ala Leu Leu Val Asp Phe Leu Leu Asn Val  
50 55 60  
Leu Ala Ile Leu Phe Ala Thr Thr Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Leu Leu  
65 70 75 80  
Leu Asn Leu Leu Leu Ile Ser Pro Ala Leu Leu Ile Leu Leu Ser Thr  
85 90 95  
Lys Arg Pro Arg Thr Pro Val Lys Ala Lys Pro Pro Arg Gln Ser Ala  
100 105 110  
Arg Ala Gly Lys Asp Asp Ser Lys His Ala Thr Ala Leu Pro Glu Ser  
115 120 125  
Leu Pro Ile His Pro Phe Leu Thr Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Val  
130 135 140  
Ile Thr Cys Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Arg Ile Phe Pro Arg  
145 150 155 160  
Arg Phe Ala Lys Val Glu Asn Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly  
165 170 175  
Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Gly Gly Val Val Ser Ala Arg Ser Leu  
180 185 190  
Leu Lys Ser Arg Thr Asn Gly Ser Lys Arg Leu Pro Leu Ala Lys Arg  
195 200 205  
Leu Ile Ala Ser Thr Arg His Ser Ile Pro Leu Leu Val Leu Gly Leu  
210 215 220  
Ile Arg Leu Tyr Ser Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Glu His Val Thr  
225 230 235 240  
Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Leu Leu Pro  
245 250 255  
Pro Phe Val Glu Val Phe Asp Ala Leu Ala Thr Ile Ile Pro Ser Tyr  
260 265 270  
Glu Val Leu Ser Val Gly Ile Ala Val Leu Tyr Gln Val Ala Leu Glu

275 280 285  
Ser Thr Asp Leu Lys Ser Tyr Ile Leu Val Ser Pro Arg Gly Pro Ser  
290 295 300  
Leu Leu Ser Lys Asn Arg Glu Gly Val Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Leu  
305 310 315 320  
Ala Ile Phe Leu Ala Gly Arg Ala Ile Gly Ile Arg Ile Ile Pro Arg  
325 330 335  
Gly Thr Ser Phe Ser Arg Ser Pro Glu Gln Ala Arg Arg Arg Val Leu  
340 345 350  
Ile Ser Leu Gly Val Gln Ala Leu Val Trp Thr Thr Leu Phe Val Leu  
355 360 365  
Asn Ser Thr Tyr Ala Met Gly Tyr Gly Ala Asn Ile Pro Val Ser Arg  
370 375 380  
Arg Leu Ala Asn Met Pro Tyr Val Leu Trp Val Ser Ala Phe Asn Thr  
385 390 395 400  
Ala Gln Leu Phe Val Phe Cys Leu Ile Glu Thr Leu Cys Phe Pro Ala  
405 410 415  
Val His Arg Thr Thr Thr Gln Glu Ser Glu Ser Glu Arg Val Asp Phe  
420 425 430  
Ala Thr Ser Arg Ile Met Ser Ala Phe Asn Lys Asn Ser Leu Ala Ile  
435 440 445  
Phe Leu Leu Ala Asn Leu Leu Thr Gly Ala Val Asn Leu Ser Ile Ser  
450 455 460  
Thr Ile Asp Ala Asn Thr Ala Gln Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Tyr  
465 470 475 480  
Ser Ser Ile Ile Thr Gly Val Ala Leu Ala Leu His His Ala Asn Ile  
485 490 495  
Lys Val Leu Pro Phe  
500

<210> 11

<211> 1648

<212> DNA

<213> *Aspergillus fumigatus*

<220>

<221> intron

<222> (122)..(198)

<220>

<221> CDS

<222> (26)..(121)

<220>

<221> CDS

<222> (199)..(1608)

<400> 11

gcaaattcccg cggcattgag tcaag atg gat cca gat tat aaa gct cgc aaa 52

Met Asp Pro Asp Tyr Lys Ala Arg Lys

1

5

gag gcc ttt gtc tca ggt ctt gca gga gga agc atc ctg gaa atc aac 100

Glu Ala Phe Val Ser Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ile Leu Glu Ile Asn

10

15

20

25

gcc gtc acc ttg gtt gct tcg gtctgtgta ctatcttatt gtggctactt 151

Ala Val Thr Leu Val Ala Ser

30

cgcttacatt gtttctcgac taaccgagtc tctttgcat caatcag gta tcc gtt 207

Val Ser Val

35

ttt ctg tgg tca att cta caa tct cgc cta tcc ttt ttc aca ccc tac 255

Phe Leu Trp Ser Ile Leu Gln Ser Arg Leu Ser Phe Phe Thr Pro Tyr

40

45

50

agc gcc gct gcc ctt ctc gtt gat ttc ctg ctc aat gta cta gct atc 303

Ser Ala Ala Ala Leu Leu Val Asp Phe Leu Leu Asn Val Leu Ala Ile

55

60

65

ttg ttc gca acc act tta tac tct tcg gcg cct ctt ctt ctc aat ctc 351

Leu Phe Ala Thr Thr Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Leu Leu Leu Asn Leu

70

75

80

ctt cta ata tct ccc gct ctg ctg ata ctc ctc tct acg aaa cgt cct 399

Leu Leu Ile Ser Pro Ala Leu Leu Ile Leu Leu Ser Thr Lys Arg Pro

85

90

95

cgg acc ccc gtc aaa gcg aaa cct cct cgc cag tcc gct aga gct ggg 447

Arg Thr Pro Val Lys Ala Lys Pro Pro Arg Gln Ser Ala Arg Ala Gly

100

105

110

115

aaa gat gac tcg aaa cat gcg aca gcc ttg cca gag tct cta ccc att 495

Lys Asp Asp Ser Lys His Ala Thr Ala Leu Pro Glu Ser Leu Pro Ile



120

125

130

cat cca ttt ctc acg aca tat cgc gcc gcc atg atg gtt atc acg tgc 543

His Pro Phe Leu Thr Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Val Ile Thr Cys

135

140

145

atc gct atc ttg gct gtg gat ttt cgc att ttt cct cgc cga ttc gcc 591

Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Arg Ile Phe Pro Arg Arg Phe Ala

150

155

160

aag gta gaa aac tgg ggt aca tca ctc atg gat ctg ggc gtt gga tgc 639

Lys Val Glu Asn Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val Gly Ser

165

170

175

ttt gtc ttt tcg ggc gga gta gta tcc gct cgc tca cta ctc aag agc 687

Phe Val Phe Ser Gly Gly Val Val Ser Ala Arg Ser Leu Leu Lys Ser

180

185

190

195

agg acc aat ggc tct aaa agg ttg cct ctt gcc aag agg ttg att gcg 735

Arg Thr Asn Gly Ser Lys Arg Leu Pro Leu Ala Lys Arg Leu Ile Ala

200

205

210

tcg acg cga cac tct att cct ctg ctc gtc ctc ggc ctg att cgg cta 783

Ser Thr Arg His Ser Ile Pro Leu Leu Val Leu Gly Leu Ile Arg Leu

215

220

225

tac agc gtc aaa ggc ttg gac tat gcg gag cac gtc acc gag tac ggc 831

Tyr Ser Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Glu His Val Thr Glu Tyr Gly

230

235

240

gta cat tgg aac ttc ttc ttt aca ttg ggt ctt ttg cct ccg ttc gtg 879

Val His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Leu Leu Pro Pro Phe Val

245

250

255

gag gtc ttc gac gcc ttg gct acg atc att ccg tca tac gag gtt ctc 927

Glu Val Phe Asp Ala Leu Ala Thr Ile Ile Pro Ser Tyr Glu Val Leu

260

265

270

275

tcc gtg ggg atc gcc gtc ttg tat caa gtt gcc cta gag tca aca gac 975

Ser Val Gly Ile Ala Val Leu Tyr Gln Val Ala Leu Glu Ser Thr Asp

280

285

290

ttg aaa agc tac atc ctc gtc tcc cct cgt ggg cca agc tta ctg tcc 1023

Leu Lys Ser Tyr Ile Leu Val Ser Pro Arg Gly Pro Ser Leu Leu Ser

295

300

305

aag aat cgt gaa ggc gtc ttc tcc ttc tca ggt tat ctc gcg att ttt 1071

Lys Asn Arg Glu Gly Val Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Leu Ala Ile Phe

310

315

320

ctt gct ggt cgt gcg atc ggc att cgg ata atc cct cgc gga act tct 1119

Leu Ala Gly Arg Ala Ile Gly Ile Arg Ile Ile Pro Arg Gly Thr Ser

325

330

335

ttc tca aga agc cca gaa cag gcc agg aga cgg gtc ctg atc agc ctt 1167

Phe Ser Arg Ser Pro Glu Gln Ala Arg Arg Arg Val Leu Ile Ser Leu

340

345

350

355

ggc gtg caa gcg tta gtg tgg acc act ctt ttt gtg ttg aac tcc act 1215

Gly Val Gln Ala Leu Val Trp Thr Thr Leu Phe Val Leu Asn Ser Thr

360

365

370

tat gcg atg gga tac gga gct aat atc cct gtc tcc cgc cgc ctc gct 1263

Tyr Ala Met Gly Tyr Gly Ala Asn Ile Pro Val Ser Arg Arg Leu Ala

375

380

385

aac atg ccc tat gtc ctt tgg gtt tcg gcg ttc aac acc gcg caa ctg 1311

Asn Met Pro Tyr Val Leu Trp Val Ser Ala Phe Asn Thr Ala Gln Leu

390

395

400

ttt gtg ttc tgc ctg atc gaa aca ctc tgc ttt cct gca gtt cat cgg 1359

Phe Val Phe Cys Leu Ile Glu Thr Leu Cys Phe Pro Ala Val His Arg

405

410

415

aca acg act caa gag agc gaa tct gag cga gtc gat ttt gct acg agc 1407

Thr Thr Thr Gln Glu Ser Glu Ser Glu Arg Val Asp Phe Ala Thr Ser

420

425

430

435

cga atc atg tcg gcc ttc aat aag aac agt ctc gcg atc ttt ctt ttg 1455

Arg Ile Met Ser Ala Phe Asn Lys Asn Ser Leu Ala Ile Phe Leu Leu

440

445

450

gcc aat ctt ctg act gga gct gtg aat ctg agc atc tcc aca att gat 1503

Ala Asn Leu Leu Thr Gly Ala Val Asn Leu Ser Ile Ser Thr Ile Asp

455

460

465

gct aat aca gcg cag gcc atc gct gtt ctc att gga tat tca tcc att 1551

Ala Asn Thr Ala Gln Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Tyr Ser Ser Ile

470

475

480

atc aca ggg gtt gct cta gca ttg cat cat gcc aat atc aaa gta ctt 1599

Ile Thr Gly Val Ala Leu Ala Leu His His Ala Asn Ile Lys Val Leu

485

490

495

cct ttc tag ggtattttacg agcaattggg ggtgtgttga agatatatag 1648

Pro Phe

500

<210> 12

<211> 2045

<212> DNA

<213> Cryptococcus neoformans

<220>

<221> intron

<222> (137)..(198)

<220>

<221> intron

<222> (892)..(942)

<220>

<221> intron

<222> (1636)..(1686)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (44)..(2001)

&lt;400&gt; 12

gtcatagcat taaatccccg ccataataag ctactgaatt gca atg ggg gat tac 55

Met Gly Asp Tyr

1

aag tcg gcc aaa gag gcc ttt gtc tcg gat aac cca ggt gct tct atc 103

Lys Ser Ala Lys Glu Ala Phe Val Ser Asp Asn Pro Gly Ala Ser Ile

5

10

15

20

tgg agt atc aac gct gtc agc ctg gtc gca ctg gtatgtagct cggtctccga 156

Trp Ser Ile Asn Ala Val Ser Leu Val Ala Leu

25

30

ggggttctgt catttggaga cgcttattaa ttgggatcgc ag gcg aca tat gct 210

Ala Thr Tyr Ala

35

ctc tgg atc gcc tta tcg ccg tac atc cgt cat gga ctc ctg aac aac 258

Leu Trp Ile Ala Leu Ser Pro Tyr Ile Arg His Gly Leu Leu Asn Asn

40

45

50

tac ctg atc tgt gtt ctt ccc cta tta ttc ggg gtg acc atc ttc tca 306

Tyr Leu Ile Cys Val Leu Pro Leu Leu Phe Gly Val Thr Ile Phe Ser

55

60

65

act tcg cct ctc gta ttt acc tct ttt ttg tcc att att tcc ctc gct 354

Thr Ser Pro Leu Val Phe Thr Ser Phe Leu Ser Ile Ile Ser Leu Ala

70

75

80

ttc atc acg aaa tcc caa aaa tgc ttc aaa tct gtc agt tcg ccc gaa 402

Phe Ile Thr Lys Ser Gln Lys Cys Phe Lys Ser Val Ser Ser Pro Glu

85

90

95

aag cca aaa ggc caa tgg cta gac gaa tca gac tcc gat gag gaa cca 450  
Lys Pro Lys Gly Gln Trp Leu Asp Glu Ser Asp Ser Asp Glu Glu Pro  
100 105 110 115  
gcg gaa cct gct tct gca gct gga tct gca gca gtc tca cca gta aag 498  
Ala Glu Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Val Ser Pro Val Lys  
120 125 130  
ctt cta cct tcc caa gtg gcg ttc gct tcg gga tcc cta tta tct ccc 546  
Leu Leu Pro Ser Gln Val Ala Phe Ala Ser Gly Ser Leu Leu Ser Pro  
135 140 145  
gat ccg aca aca tcc ccc atg tcg cca agt agt tct tca gct tca gga 594  
Asp Pro Thr Thr Ser Pro Met Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ala Ser Gly  
150 155 160  
cat gaa gac cct ttg ggg att atg ggc gtt aac aga cgg agg tcg cta 642  
His Glu Asp Pro Leu Gly Ile Met Gly Val Asn Arg Arg Arg Ser Leu  
165 170 175  
tta gaa gga gtt tcg ctt gat gtt ccg tca cat atc gac tcc aag gtc 690  
Leu Glu Gly Val Ser Leu Asp Val Pro Ser His Ile Asp Ser Lys Val  
180 185 190 195  
aga ata tct cct gtt ccc tac ttg agg ctc aaa aag tct agg gca acg 738  
Arg Ile Ser Pro Val Pro Tyr Leu Arg Leu Lys Lys Ser Arg Ala Thr  
200 205 210  
aag gcg caa tgg gtg aaa gaa aag gga aga tta cca ttt ttg aca gtg 786  
Lys Ala Gln Trp Val Lys Glu Lys Gly Arg Leu Pro Phe Leu Thr Val  
215 220 225  
tac cga gcg cac atg atg ctc atg act gtt atc tgc atc ttg gcg gta 834  
Tyr Arg Ala His Met Met Leu Met Thr Val Ile Cys Ile Leu Ala Val  
230 235 240  
gat ttt gaa gtg ttt cct aga tgg cag ggc aag tgc gaa gat ttt ggt 882  
Asp Phe Glu Val Phe Pro Arg Trp Gln Gly Lys Cys Glu Asp Phe Gly

245	250	255	
act agt ctg gtaagctttc cticagccat ggtccagtgc tcaccgctct			931
Thr Ser Leu			
260			
acttgccgta g atg gac gtg ggt gtc ggg tca ttc gtc ttt tcc ctc ggt			981
Met Asp Val Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Leu Gly			
265	270	275	
ctc gtc tcc aca aaa tct ctt tct cct cca cct cca act cct acg ccc			1029
Leu Val Ser Thr Lys Ser Leu Ser Pro Pro Pro Pro Thr Pro Thr Pro			
280	285	290	
tcc tcg ccc gct ctc aac tct cac atc att ccc ctc acc ccg tcc ccg			1077
Ser Ser Pro Ala Leu Asn Ser His Ile Ile Pro Leu Thr Pro Ser Pro			
295	300	305	
ttc act tcc atc ctc atc tcg ctc cga aaa tcc atc ccc atc ctc gtc			1125
Phe Thr Ser Ile Leu Ile Ser Leu Arg Lys Ser Ile Pro Ile Leu Val			
310	315	320	
ctc ggc ttt ata cgg ttg att atg gtc aag gga tct gat tat cct gag			1173
Leu Gly Phe Ile Arg Leu Ile Met Val Lys Gly Ser Asp Tyr Pro Glu			
325	330	335	
cat gtg acg gag tac ggc gtg cac tgg aat ttc ttc ttc acc ctc gca			1221
His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Ala			
340	345	350	355
ttg gtt cct gtg ctc gcc gtg ggc att cga cca ttg acg cag tgg ctt			1269
Leu Val Pro Val Leu Ala Val Gly Ile Arg Pro Leu Thr Gln Trp Leu			
360	365	370	
cgc tgg agt gtg ctt ggg gta atc atc tct ttg ctg cat cag ctg tgg			1317
Arg Trp Ser Val Leu Gly Val Ile Ile Ser Leu Leu His Gln Leu Trp			
375	380	385	
tta aca tat tat ctc caa tcc atc gtc ttc tca ttc ggc cgg tca ggt			1365

Leu Thr Tyr Tyr Leu Gln Ser Ile Val Phe Ser Phe Gly Arg Ser Gly  
 390 395 400  
 atc ttt cta gca aac aag gaa ggc ttc tcc tct ctt cct ggt tat ctt 1413  
 Ile Phe Leu Ala Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Leu Pro Gly Tyr Leu  
 405 410 415  
 tcc ata ttt ttg atc ggc ttg tct att gga gat cat gtt tta agg ctc 1461  
 Ser Ile Phe Leu Ile Gly Leu Ser Ile Gly Asp His Val Leu Arg Leu  
 420 425 430 435  
 agt tta cca cca aga aga gag agg gtc gtg tca gaa aca aat gaa gag 1509  
 Ser Leu Pro Pro Arg Arg Glu Arg Val Val Ser Glu Thr Asn Glu Glu  
 440 445 450  
 cat gag cag agt cat ttt gag aga aaa aaa ttg gat ttg att atg gag 1557  
 His Glu Gln Ser His Phe Glu Arg Lys Lys Leu Asp Leu Ile Met Glu  
 455 460 465  
 ttg att gga tat agc tta ggc tgg tgg gca ctc tta gga ggc tgg att 1605  
 Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Trp Trp Ala Leu Leu Gly Gly Trp Ile  
 470 475 480  
 tgg gcc ggc ggg gag gta tcc agg cgt tta gtaagtggac atcttttgta 1655  
 Trp Ala Gly Gly Glu Val Ser Arg Arg Leu  
 485 490  
 atattgtacc tataactaatc cctgcataaa g gcc aac gct cct tat gta ttt 1707  
 Ala Asn Ala Pro Tyr Val Phe  
 495 500  
 tgg gta gcg gca tac aat acc acc ttt ctc ctc ggc tac ctc ctc ctt 1755  
 Trp Val Ala Ala Tyr Asn Thr Thr Phe Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Leu  
 505 510 515  
 acc cac att att cca tct ccc acc tct tcc caa aca tca cca tcg atc 1803  
 Thr His Ile Ile Pro Ser Pro Thr Ser Ser Gln Thr Ser Pro Ser Ile  
 520 525 530



tta gtg cct ccc ttg ctc gac gct atg aat aaa aac ggt ctc gcg ata 1851  
 Leu Val Pro Pro Leu Leu Asp Ala Met Asn Lys Asn Gly Leu Ala Ile  
 535 540 545  
 ttt ttg gcg gcc aac ttg ctt aca gga ctg gtg aat gtg agc atg aag 1899  
 Phe Leu Ala Ala Asn Leu Leu Thr Gly Leu Val Asn Val Ser Met Lys  
 550 555 560  
 aca atg tat gcg ccg gcg tgg ttg tca atg ggg gtg tta atg ttg tat 1947  
 Thr Met Tyr Ala Pro Ala Trp Leu Ser Met Gly Val Leu Met Leu Tyr  
 565 570 575 580  
 acc ttg aca atc agt tgt gta ggg tgg ata ctg aaa gga cgg agg atc 1995  
 Thr Leu Thr Ile Ser Cys Val Gly Trp Ile Leu Lys Gly Arg Arg Ile  
 585 590 595  
 aag ata tagttaaagt gtttaccatg caggatactg agtatctcgg ttca 2045  
 Lys Ile

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1797

&lt;212&gt; DNA

<213> *Cryptococcus neoformans*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1794)

&lt;400&gt; 13

atg ggg gat tac aag tcg gcc aaa gag gcc ttt gtc tcg gat aac cca 48  
 Met Gly Asp Tyr Lys Ser Ala Lys Glu Ala Phe Val Ser Asp Asn Pro

1

5

10

15

ggt gct tct atc tgg agt atc aac gct gtc agc ctg gtc gca ctg gcg 96  
 Gly Ala Ser Ile Trp Ser Ile Asn Ala Val Ser Leu Val Ala Leu Ala  
                   20                                  25                                  30  
 aca tat gct ctc tgg atc gcc tta tcg ccg tac atc cgt cat gga ctc 144  
 Thr Tyr Ala Leu Trp Ile Ala Leu Ser Pro Tyr Ile Arg His Gly Leu  
                   35                                  40                                  45  
 ctg aac aac tac ctg atc tgt gtt ctt ccc cta tta ttc ggg gtg acc 192  
 Leu Asn Asn Tyr Leu Ile Cys Val Leu Pro Leu Leu Phe Gly Val Thr  
                   50                                  55                                  60  
 atc ttc tca act tcg cct ctc gta ttt acc tct ttt ttg tcc att att 240  
 Ile Phe Ser Thr Ser Pro Leu Val Phe Thr Ser Phe Leu Ser Ile Ile  
                   65                                  70                                  75                                  80  
 tcc ctc gct ttc atc acg aaa tcc caa aaa tgc ttc aaa tct gtc agt 288  
 Ser Leu Ala Phe Ile Thr Lys Ser Gln Lys Cys Phe Lys Ser Val Ser  
                                   85                                  90                                  95  
 tcg ccc gaa aag cca aaa ggc caa tgg cta gac gaa tca gac tcc gat 336  
 Ser Pro Glu Lys Pro Lys Gly Gln Trp Leu Asp Glu Ser Asp Ser Asp  
                   100                                  105                                  110  
 gag gaa cca gcg gaa cct gct tct gca gct gga tct gca gca gtc tca 384  
 Glu Glu Pro Ala Glu Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Val Ser  
                   115                                  120                                  125  
 cca gta aag ctt cta cct tcc caa gtg gcg ttc gct tcg gga tcc cta 432  
 Pro Val Lys Leu Leu Pro Ser Gln Val Ala Phe Ala Ser Gly Ser Leu  
                   130                                  135                                  140  
 tta tct ccc gat ccg aca aca tcc ccc atg tcg cca agt agt tct tca 480  
 Leu Ser Pro Asp Pro Thr Thr Ser Pro Met Ser Pro Ser Ser Ser Ser  
                   145                                  150                                  155                                  160  
 gct tca gga cat gaa gac cct ttg ggg att atg ggc gtt aac aga cgg 528  
 Ala Ser Gly His Glu Asp Pro Leu Gly Ile Met Gly Val Asn Arg Arg

165	170	175	
agg tcg cta tta gaa gga gtt tcg ctt gat gtt ccg tca cat atc gac	576		
Arg Ser Leu Leu Glu Gly Val Ser Leu Asp Val Pro Ser His Ile Asp			
180	185	190	
tcc aag gtc aga ata tct cct gtt ccc tac ttg agg ctc aaa aag tct	624		
Ser Lys Val Arg Ile Ser Pro Val Pro Tyr Leu Arg Leu Lys Lys Ser			
195	200	205	
agg gca acg aag gcg caa tgg gtg aaa gaa aag gga aga tta cca ttt	672		
Arg Ala Thr Lys Ala Gln Trp Val Lys Glu Lys Gly Arg Leu Pro Phe			
210	215	220	
ttg aca gtg tac cga gcg cac atg atg ctc atg act gtt atc tgc atc	720		
Leu Thr Val Tyr Arg Ala His Met Met Leu Met Thr Val Ile Cys Ile			
225	230	235	240
ttg gcg gta gat ttt gaa gtg ttt cct aga tgg cag ggc aag tgc gaa	768		
Leu Ala Val Asp Phe Glu Val Phe Pro Arg Trp Gln Gly Lys Cys Glu			
245	250	255	
gat ttt ggt act agt ctg atg gac gtg ggt gtc ggg tca ttc gtc ttt	816		
Asp Phe Gly Thr Ser Leu Met Asp Val Gly Val Gly Ser Phe Val Phe			
260	265	270	
tcc ctc ggt ctc gtc tcc aca aaa tct ctt tct cct cca cct cca act	864		
Ser Leu Gly Leu Val Ser Thr Lys Ser Leu Ser Pro Pro Pro Pro Thr			
275	280	285	
cct acg ccc tcc tcg ccc gct ctc aac tct cac atc att ccc ctc acc	912		
Pro Thr Pro Ser Ser Pro Ala Leu Asn Ser His Ile Ile Pro Leu Thr			
290	295	300	
ccg tcc ccg ttc act tcc atc ctc atc tcg ctc cga aaa tcc atc ccc	960		
Pro Ser Pro Phe Thr Ser Ile Leu Ile Ser Leu Arg Lys Ser Ile Pro			
305	310	315	320
atc ctc gtc ctc ggc ttt ata cgg ttg att atg gtc aag gga tct gat	1008		

Ile Leu Val Leu Gly Phe Ile Arg Leu Ile Met Val Lys Gly Ser Asp	
325	330 335
tat cct gag cat gtg acg gag tac ggc gtg cac tgg aat ttc ttc ttc	1056
Tyr Pro Glu His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe	
340	345 350
acc ctc gca ttg gtt cct gtg ctc gcc gtg ggc att cga cca ttg acg	1104
Thr Leu Ala Leu Val Pro Val Leu Ala Val Gly Ile Arg Pro Leu Thr	
355	360 365
cag tgg ctt cgc tgg agt gtg ctt ggg gta atc atc tct ttg ctg cat	1152
Gln Trp Leu Arg Trp Ser Val Leu Gly Val Ile Ile Ser Leu Leu His	
370	375 380
cag ctg tgg tta aca tat tat ctc caa tcc atc gtc ttc tca ttc ggc	1200
Gln Leu Trp Leu Thr Tyr Tyr Leu Gln Ser Ile Val Phe Ser Phe Gly	
385	390 395 400
cgg tca ggt atc ttt cta gca aac aag gaa ggc ttc tcc tct ctt cct	1248
Arg Ser Gly Ile Phe Leu Ala Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Leu Pro	
405	410 415
ggt tat ctt tcc ata ttt ttg atc ggc ttg tct att gga gat cat gtt	1296
Gly Tyr Leu Ser Ile Phe Leu Ile Gly Leu Ser Ile Gly Asp His Val	
420	425 430
tta agg ctc agt tta cca cca aga aga gag agg gtc gtg tca gaa aca	1344
Leu Arg Leu Ser Leu Pro Pro Arg Arg Glu Arg Val Val Ser Glu Thr	
435	440 445
aat gaa gag cat gag cag agt cat ttt gag aga aaa aaa ttg gat ttg	1392
Asn Glu Glu His Glu Gln Ser His Phe Glu Arg Lys Lys Leu Asp Leu	
450	455 460
att atg gag ttg att gga tat agc tta ggc tgg tgg gca ctc tta gga	1440
Ile Met Glu Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Trp Trp Ala Leu Leu Gly	
465	470 475 480

ggc tgg att tgg gcc ggc ggg gag gta tcc agg cgt tta gcc aac gct 1488  
 Gly Trp Ile Trp Ala Gly Gly Glu Val Ser Arg Arg Leu Ala Asn Ala  
 485 490 495  
 cct tat gta ttt tgg gta gcg gca tac aat acc acc ttt ctc ctc ggc 1536  
 Pro Tyr Val Phe Trp Val Ala Ala Tyr Asn Thr Thr Phe Leu Leu Gly  
 500 505 510  
 tac ctc ctc ctt acc cac att att cca tct ccc acc tct tcc caa aca 1584  
 Tyr Leu Leu Leu Thr His Ile Ile Pro Ser Pro Thr Ser Ser Gln Thr  
 515 520 525  
 tca cca tcg atc tta gtg cct ccc ttg ctc gac gct atg aat aaa aac 1632  
 Ser Pro Ser Ile Leu Val Pro Pro Leu Leu Asp Ala Met Asn Lys Asn  
 530 535 540  
 ggt ctc gcg ata ttt ttg gcg gcc aac ttg ctt aca gga ctg gtg aat 1680  
 Gly Leu Ala Ile Phe Leu Ala Ala Asn Leu Leu Thr Gly Leu Val Asn  
 545 550 555 560  
 gtg agc atg aag aca atg tat gcg ccg gcg tgg ttg tca atg ggg gtg 1728  
 Val Ser Met Lys Thr Met Tyr Ala Pro Ala Trp Leu Ser Met Gly Val  
 565 570 575  
 tta atg ttg tat acc ttg aca atc agt tgt gta ggg tgg ata ctg aaa 1776  
 Leu Met Leu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Cys Val Gly Trp Ile Leu Lys  
 580 585 590  
 gga cgg agg atc aag ata tag 1797  
 Gly Arg Arg Ile Lys Ile  
 595

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 598

&lt;212&gt; PRT

<213> *Cryptococcus neoformans*

&lt;400&gt; 14

Met Gly Asp Tyr Lys Ser Ala Lys Glu Ala Phe Val Ser Asp Asn Pro  
1 5 10 15  
Gly Ala Ser Ile Trp Ser Ile Asn Ala Val Ser Leu Val Ala Leu Ala  
20 25 30  
Thr Tyr Ala Leu Trp Ile Ala Leu Ser Pro Tyr Ile Arg His Gly Leu  
35 40 45  
Leu Asn Asn Tyr Leu Ile Cys Val Leu Pro Leu Leu Phe Gly Val Thr  
50 55 60  
Ile Phe Ser Thr Ser Pro Leu Val Phe Thr Ser Phe Leu Ser Ile Ile  
65 70 75 80  
Ser Leu Ala Phe Ile Thr Lys Ser Gln Lys Cys Phe Lys Ser Val Ser  
85 90 95  
Ser Pro Glu Lys Pro Lys Gly Gln Trp Leu Asp Glu Ser Asp Ser Asp  
100 105 110  
Glu Glu Pro Ala Glu Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Val Ser  
115 120 125  
Pro Val Lys Leu Leu Pro Ser Gln Val Ala Phe Ala Ser Gly Ser Leu  
130 135 140  
Leu Ser Pro Asp Pro Thr Thr Ser Pro Met Ser Pro Ser Ser Ser Ser  
145 150 155 160  
Ala Ser Gly His Glu Asp Pro Leu Gly Ile Met Gly Val Asn Arg Arg  
165 170 175  
Arg Ser Leu Leu Glu Gly Val Ser Leu Asp Val Pro Ser His Ile Asp  
180 185 190  
Ser Lys Val Arg Ile Ser Pro Val Pro Tyr Leu Arg Leu Lys Lys Ser  
195 200 205

Arg Ala Thr Lys Ala Gln Trp Val Lys Glu Lys Gly Arg Leu Pro Phe  
210 215 220

Leu Thr Val Tyr Arg Ala His Met Met Leu Met Thr Val Ile Cys Ile  
225 230 235 240

Leu Ala Val Asp Phe Glu Val Phe Pro Arg Trp Gln Gly Lys Cys Glu  
245 250 255

Asp Phe Gly Thr Ser Leu Met Asp Val Gly Val Gly Ser Phe Val Phe  
260 265 270

Ser Leu Gly Leu Val Ser Thr Lys Ser Leu Ser Pro Pro Pro Pro Thr  
275 280 285

Pro Thr Pro Ser Ser Pro Ala Leu Asn Ser His Ile Ile Pro Leu Thr  
290 295 300

Pro Ser Pro Phe Thr Ser Ile Leu Ile Ser Leu Arg Lys Ser Ile Pro  
305 310 315 320

Ile Leu Val Leu Gly Phe Ile Arg Leu Ile Met Val Lys Gly Ser Asp  
325 330 335

Tyr Pro Glu His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe  
340 345 350

Thr Leu Ala Leu Val Pro Val Leu Ala Val Gly Ile Arg Pro Leu Thr  
355 360 365

Gln Trp Leu Arg Trp Ser Val Leu Gly Val Ile Ile Ser Leu Leu His  
370 375 380

Gln Leu Trp Leu Thr Tyr Tyr Leu Gln Ser Ile Val Phe Ser Phe Gly  
385 390 395 400

Arg Ser Gly Ile Phe Leu Ala Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Leu Pro  
405 410 415

Gly Tyr Leu Ser Ile Phe Leu Ile Gly Leu Ser Ile Gly Asp His Val  
420 425 430

Leu Arg Leu Ser Leu Pro Pro Arg Arg Glu Arg Val Val Ser Glu Thr

435                                      440                                      445  
Asn Glu Glu His Glu Gln Ser His Phe Glu Arg Lys Lys Leu Asp Leu  
450                                      455                                      460  
Ile Met Glu Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Trp Trp Ala Leu Leu Gly  
465                                      470                                      475                                      480  
Gly Trp Ile Trp Ala Gly Gly Glu Val Ser Arg Arg Leu Ala Asn Ala  
485                                      490                                      495  
Pro Tyr Val Phe Trp Val Ala Ala Tyr Asn Thr Thr Phe Leu Leu Gly  
500                                      505                                      510  
Tyr Leu Leu Leu Thr His Ile Ile Pro Ser Pro Thr Ser Ser Gln Thr  
515                                      520                                      525  
Ser Pro Ser Ile Leu Val Pro Pro Leu Leu Asp Ala Met Asn Lys Asn  
530                                      535                                      540  
Gly Leu Ala Ile Phe Leu Ala Ala Asn Leu Leu Thr Gly Leu Val Asn  
545                                      550                                      555                                      560  
Val Ser Met Lys Thr Met Tyr Ala Pro Ala Trp Leu Ser Met Gly Val  
565                                      570                                      575  
Leu Met Leu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Cys Val Gly Trp Ile Leu Lys  
580                                      585                                      590  
Gly Arg Arg Ile Lys Ile  
595

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



<400> 15

ggaattcatg tcgactttaa aacagagaaa agagg

35

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 16

gcatcgattt atagcttaat gaatattctt tttct atac

34

<210> 17

<211> 60

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 17

atggcaacag tacatcagga gaatatgtcg actttaaaac cggatccccg tcgtttaaac 60

<210> 18

<211> 60

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 18

ttatagctta atgaatattc tttttctata caagaaaacc gaattcgagc tcgtttaaac 60

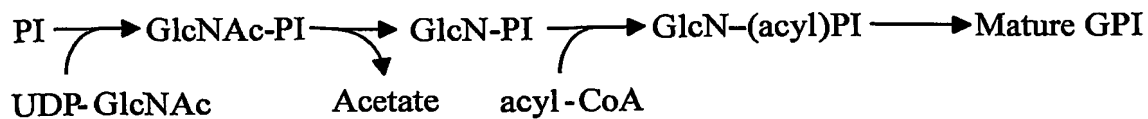
【図面の簡単な説明】

【図 1】 GPIの生合成経路を示した図である。

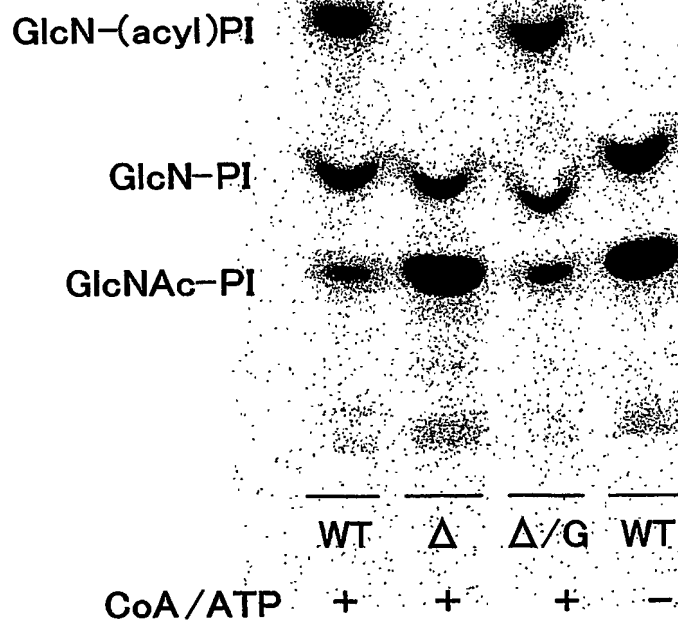
【図 2】 被検化合物による標識CompoundB2の膜画分への結合に対する阻害を示す写真である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 真菌細胞壁へのGPIアンカー蛋白質の輸送を阻害して真菌細胞壁の合成を阻害するとともに、宿主細胞への付着を阻害して、病原性真菌が病原性を発揮できないようにする抗真菌剤を開発することにある。

【解決手段】 GWT1蛋白を発現した膜画分を用いた簡単なBinding assayにより、GPIアンカー蛋白質の真菌細胞壁への輸送を阻害する化合物がスクリーニング可能となった。GPIアンカー蛋白質が細胞壁に輸送される過程を阻害することにより、真菌細胞壁の合成を阻害し、同時に宿主細胞への付着も阻害する新規抗真菌剤が創出できる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 3 3 9 4 1 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 0 2 1 7 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 1 0 号

氏 名

エーザイ株式会社

特願 2 0 0 2 - 3 3 9 4 1 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年    4 月    2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所